

多重蛍光染色試料における蛍光スペクトルの線形性に関する考察

森下壮一郎^{*†} 横田秀夫^{*} 橋口博樹[‡] 姫野龍太郎^{*†} 三島健稔^{‡†}

^{*}独立行政法人 理化学研究所 生体力学シミュレーション特別研究ユニット

351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

[†]東京大学 人工物工学研究センター

277-8568 千葉県柏市柏の葉 5-1-5

[‡]埼玉大学工学部 情報システム工学科

338-8570 埼玉県さいたま市桜区下大久保 255

E-mail: mori@race.u-tokyo.ac.jp, hyokota@riken.jp, hiro@ms.ics.saitama-u.ac.jp,
himeno@riken.jp, mishima@ics.saitama-u.ac.jp

要旨 分子生物学の分野で広く行われている多重蛍光染色試料の観察には、重なり合った蛍光の分離が必要である。多重蛍光には非線形の要素があるにも関わらず、従来の分離手法は線形結合モデルを仮定している。さらに真の蛍光強度の計測が困難であるので、その妥当性の検証が十分ではなかった。本稿では、色素濃度および混合比率が既知である試料の蛍光スペクトルを多変量解析手法を用いて分析し、その線形性を検証する。

1 はじめに

ゲノム研究の結果、遺伝子発現プロセスを知るためには、個々の遺伝子ではなく遺伝子全体を対象とするゲノムワイドな研究が必要であることが見いだされた。すなわち、複数遺伝子の発現を同時に追跡し、それらの相互作用を知ることが必須になった。そのために試料を多重蛍光染色してタンパク質を同定したり生体形状を観察したりすることは有用である。しかしながら、多種の蛍光色素を同時に用いるとクロストークによってそれぞれの蛍光を正しく観察することが困難になる。

この問題を解決するために、分光分析による蛍光分離が行われている。現在もっとも有効な手法とされているのは、Linear Unmixing と呼ばれる手法である [1, 2]。これに限らず多くの分離手法はスペクトルの線形結合モデルを仮定しているが、多重蛍光には FRET や再吸収などの非線形の要素があることが知られており、前提として妥当ではない。

いずれにせよ分離結果と真の蛍光強度との比較を行うことでその妥当性を検証できるのであるが、一般にこれらの手法の評価には分光スペクトル画像が用いられており、真の蛍光強度を知ることはできない。なぜならば、この画像からは真の蛍光強度を知るために必要な指標を得ることが困難だからである。

すなわち、従来法はその確度についての検証が十分ではない。これを解決するには、各色素の濃度と混合比率とが既知の試料を測定して得られた蛍光強度の分析が必要である。

以上に基づき、本稿では各色素の濃度と混合比率とを変えた試料の蛍光スペクトルを測

定し、蛍光強度と混合スペクトルとのそれぞれについて多変量解析手法を適用して色素濃度に対する線形性を評価する。

2 蛍光の線形性

2.1 蛍光観察

蛍光色素は励起光と異なる波長で蛍光を発するので、光学フィルタを適切に組み合わせることで染色した組織のみの分布や形状を観察することができる。

蛍光色素は分子構造によって励起されやすい波長や蛍光が強い波長がそれぞれ異なり、この違いが蛍光色素を特徴づけている。また、励起されやすい波長や蛍光が強い波長には一定の幅があり、それぞれ吸収スペクトル、蛍光スペクトルと呼ばれる。さらにそのピークは特に励起波長、蛍光波長と呼ばれる。

一般的な蛍光観察は、使用した色素の励起波長近辺の波長を持つ光を照射しながら、その波長を持つ光を遮る光学フィルタを用いて観察を行う。これは、散乱光を取り除き蛍光のみを観察するためである。

複数の色素を同時に用いたときも、蛍光のみを観察しようとする点では同様であるが、さらにそれぞれの蛍光の分離が必要になる。例えば、蛍光波長が異なる色素を用いたときは、それぞれの波長の光を別々に透過するフィルタを用いて観察する。あるいは励起波長が大きく異なる色素を用いて、それぞれの波長の光を照射して観察することもある。いずれにせよ、蛍光スペクトルには一定の幅があるため、光学フィルタによる分離ではクロストークの問題を避けられない。

2.2 線形結合モデルに基づく蛍光分離手法

これを解決するために蛍光を分光してそのスペクトルを解析することによる蛍光の分離が行われている。その代表的な手法である Linear Unmixing について以下に述べる。

蛍光を分光し、各波長の信号強度を並べた L 次元列ベクトルを x と表す。そして染色に用いた蛍光色素の数を N とする。またリファレンスとして、色素 i ($i = 1, \dots, N$) のみが蛍光しているスペクトルが L 次元列ベクトル r_i として得られているとする。さらに各色素の真の蛍光強度を y_i とし、これを並べた N 次元列ベクトルを y と表す。

各色素の蛍光が線形に重ね合わされると仮定すると、観測されるスペクトル x は、リファレンス r_i を並べた行列 $R = (r_1, r_i, \dots, r_N)$ と真の蛍光強度 y との線形結合として次のように表される。

$$x = Ry \tag{1}$$

これをスペクトルの線形結合モデルと呼ぶ。

蛍光の分離の問題は、混合スペクトル x とリファレンス行列 R から、未知である真の蛍光強度 y を求めることである。これは式 (1) から一般化逆行列を用いて次のように計算できる。

$$y = R^{-1}x \tag{2}$$

ここに、 R^{-1} は R の一般化逆行列である。

2.3 線形性の検証

以上に述べた Linear Unmixing は、次の2点の線形性を仮定している。

- 単一色素の蛍光スペクトルが蛍光濃度について線形である
- 混合スペクトルが真の蛍光強度とリファレンスとの線形結合で記述できる

前者については、一般に蛍光強度が蛍光濃度にほぼ比例することは知られているが、全ての波長にわたってそれが保証されているわけではない。もし蛍光濃度によってスペクトルの概形が異なることがあれば線形結合モデルの前提に反する。また後者についても、多重蛍光には FRET や再吸収などの非線形の要素があるので必ず成立するとは限らない。

以下、それぞれの線形性の検証方法について述べる。

単一色素の蛍光強度の線形性

蛍光スペクトルの線形性について論じる前に、まず蛍光強度の線形性の検証方法について述べる。

蛍光強度が蛍光濃度について線形であるか否かは、これらが次に示すモデルに従うか否かを検証することで確かめられる。

$$y = a_i c + b_i \quad (3)$$

ここに、蛍光強度を y 、蛍光濃度を c とし、係数 a_i, b_i は色素 i 毎に決まる定数とする。

この式を満たすような係数 a_i, b_i は、回帰分析により求められる。ただし、 $a_i \neq 0$ であっても $b_i = 0$ でなければ蛍光強度が蛍光濃度について線形であると言うことはできない。しかしそうでなくとも b_i をバイアスと見なして差を取ることで $b_i = 0$ の場合と同様に扱うことができる。さらに決定係数を求め、その有意性について検定することで、モデルの当てはまりの良さを検証することができる。

単一色素の蛍光スペクトルの線形性

スペクトルの概形についても線形性が成り立つことを確認するために、式 (3) に基づいて次のモデルを仮定する。

$$y_j = a_{ij} c + b_{ij} \quad (4)$$

ここに、 y_j は各波長 j における蛍光強度、 a_{ij}, b_{ij} は各波長 j において色素 i 毎にそれぞれ決まる係数である。

式 (4) を用いて、蛍光強度のときと同様に回帰分析を施すことで各波長における線形性を検討することができる。しかしながら、蛍光強度が小さい波長、すなわち分散が小さい波長の線形性と大きい波長の線形性とを同じ重みで扱うべきではない。したがって、各波長における線形性を総合的に判断できるような指標を導入する必要がある。

本稿ではその指標を得るために、蛍光スペクトルに主成分分析を施す。

一般に多変量で表されるパターンは次元数が冗長であることが多く、ある程度の情報が失われるのを許せば、より少ない次元数で十分に表すことができる。この操作を次元圧縮

と呼ぶ。主成分分析はそのための一手法であり、各変量の分散に着目してそれをよく表す変量とその寄与率を求めるものである。そして各変量についてその累積寄与率を見ることで、パターンを表現するために必要な次元数を決定できる。

主成分分析の結果、蛍光スペクトルのパターンが一変量で十分表現できることが確認できれば、その変量を改めて y として式 (3) に当てはめることで、各波長の重みを総合的に判断した線形性の検証が可能になる。

2.4 多重染色のときの線形性の検証

以上までの手続きにより単一色素の蛍光スペクトルの線形性を確認できれば、混合スペクトルの線形性についてもほぼ同様の方法で検証できる。

色素 i の色素濃度が既知である蛍光スペクトル x_k と、その色素濃度 c_{ki} が与えられたとき、式 (2) により、その蛍光強度 $y_k = {}^t(y_{k1}, \dots, y_{kN})$ は次のように計算される。

$$y_k = R^{-1}x_k \quad (5)$$

こうして得られた y_{ki} を用いて次の値を計算する。

$$PRESS = \sum_{k=1}^n (\hat{c}_{ki} - c_{ki}) \quad (6)$$

ここに、 \hat{c}_{ki} は y_{ki} を式 (4) の y に代入して c_{ki} を計算して得られる値を表す。

さらにデータの分散を用いて PRESS を正規化して 1 との差を取ったものを Q^2 と呼び、これを予測性能の指標とする。

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{\sum_{k=1}^n (c_{ki} - \bar{c}_i)} \quad (7)$$

ここに、 \bar{c}_i は c_{ki} の平均値を表す。

予測値と実測値が完全に一致しているとき、PRESS は 0 になるので Q^2 は 1 になる。この値を比較することで予測性能を定量的に評価できる。

3 検証実験

蛍光強度および混合スペクトルのそれぞれについて色素濃度に対する線形性を検証するために、まず各色素の濃度と混合比率とを変えた試料の蛍光スペクトルを測定した。そして前節で述べた線形性の検証手法を適用して線形モデルの適合性を評価した。

3.1 蛍光スペクトルの測定

実験装置

分光スペクトルの計測には、分光蛍光光度計 (日立 F-4500) およびオートサンプラー (日立 AS-3000) と、制御用

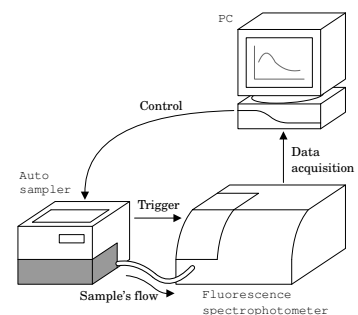


図 1 システムの概略図

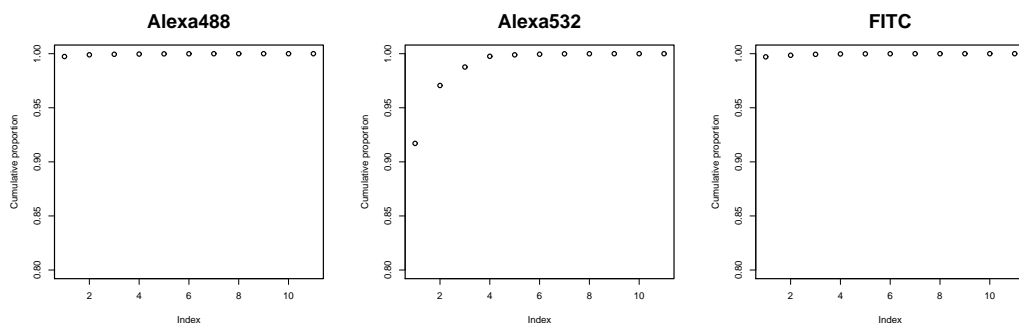


図 2 各色素の主成分分析結果の累積寄与率

PCで構築された自動計測システムを用いた。なお、オートサンプラーは蛍光の褪色を防ぐために特別に遮光が施されたものである。システムの概略を図1に示す。オートサンプラーは、フローセルに試料を流入すると分光蛍光光度計にトリガをかける。分光蛍光光度計はそれを受け測定を開始する。測定が終了すると、流路は99.5%のエタノールで洗浄され、さらに純水ですすぎが行われる。以上の手続きが自動で行われる。

蛍光色素

Alexa-488, Alexa-532, FITC(fluorescein)の3種の蛍光色素を2つずつ組み合わせ、それぞれの濃度比率を変えた混合試料のスペクトルを測定した。各色素の濃度を表1に示す。なお、測定条件は表2のように設定した。

表 1 各色素の濃度

Reagent	Concentration	Volume ratio
Alexa-488	20 μ g/ml	0/20, 1/20, 2/20, 3/20,
Alexa-532	20 μ g/ml	4/20, 5/20, 6/20, 7/20,
FITC	1 μ g/ml	8/20, 9/20

表 2 測定条件

パラメータ	設定
光源	150W xenon lamp
スリット幅	Ex: 5.0 nm, Em: 5.0 nm
	Ex: 488 nm, Em: 510 to 560 nm
波長刻み幅	Ex: 5.0 nm, Em: 5.0 nm
波長走査速度	30,000 nm/min
フォトマル電圧	700 V
レスポンス	0.01 s

3.2 単一色素のときの線形性

まず単一色素の分光スペクトルについてその線形性を確認する。

各色素の濃度を10段階に変化させて作成した試料の分光スペクトルを主成分分析して得られた累積寄与率を図2に示す。なお、第1主成分の寄与率はAlexa-488では0.997、Alexa-532では0.917、FITCでは0.997であった。

累積寄与率を見ると、Alexa-488とFITCでは第1主成分のみでほぼ1(100%)に達している。すなわち、この2つの色素の分光スペクトルは1変量で説明される。一方、Alexa-532では第4主成分まで用いなければならないが、第1主成分だけでも寄与率が0.917に達している。本実験では照射光の波長を488nmに設定しているため、励起波長が532nmであ

る Alexa-532 の蛍光強度が弱くノイズの影響を受けやすいことを考慮すれば、Alexa-532 の分光スペクトルも 1 変量で説明できると考えることは妥当であろう。

以上の結果をふまえて、各色素の色素濃度を説明変数、蛍光強度 (スペクトルの第一主成分) を被説明変数として回帰分析を施した結果を図 3 に示す。さらに、決定係数および調整済み決定係数、 p 値を表 3 に示す。

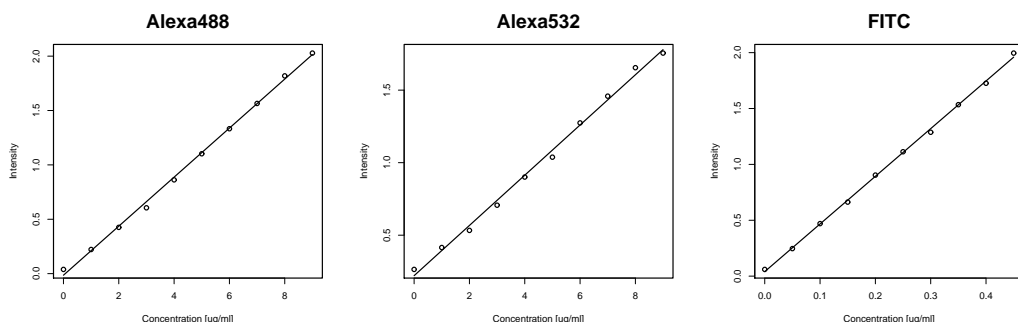


図 3 単一色素の蛍光スペクトルの回帰分析結果

表 3 単一色素の蛍光スペクトルを回帰分析した結果の決定係数と p 値

色素	決定係数	調整済み決定係数	p 値
Alexa-488	0.998	0.998	3.76×10^{-12}
Alexa-532	0.996	0.995	1.03×10^{-10}
FITC	0.999	0.999	2.60×10^{-13}

決定係数を見ることでモデルの妥当性を評価できる。ただし、決定係数は自由度が大きくなるほど大きくなる傾向があるので、それを調整した調整済み決定係数を用いて評価する。なお、 p 値は決定係数が有意でない確率を示す。 p 値が大きいと、決定係数が有意でないという帰無仮説を棄却できないので、仮に大きな決定係数が得られたとしてもそれによりモデルの妥当性を評価することはできない。

いずれの色素の調整済み決定係数も 0.99 を超えており、またそれが有意でない確率も極めて小さい。したがって、単一色素の蛍光スペクトルについて線形モデルを仮定することは妥当である。

3.3 多重染色のときの線形性

前節で得られた結果を踏まえて、複数の色素を用いたときの分光スペクトルの線形性を検証する。

図 4, 5, 6 に各色素の組み合わせにおける真の色素濃度と分光スペクトルからの推定値を示す。横軸が真の色素濃度であり、縦軸が推定値である。推定値の分布は Tukey の箱ひげ図と呼ばれる方式で表した。線分は中央値を表す。箱は上端が第 1 四分位数、下端が第 3 四分位数を表し、ひげは最大値と最小値を表す。ただし、四分位範囲 (IQR: Inter-Quartile Range) から外れるものは丸でプロットした。さらに傾き 1 の原点を通る直線で推定値が

取るべき値を示した。

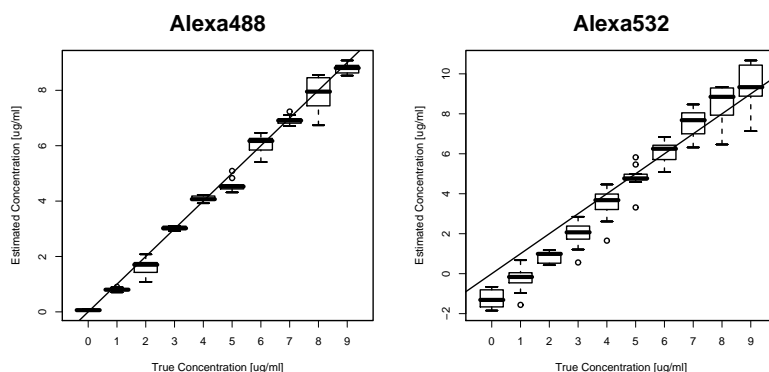


図 4 Alexa488 と Alexa532 との組み合わせの時の真の色素濃度と推定値

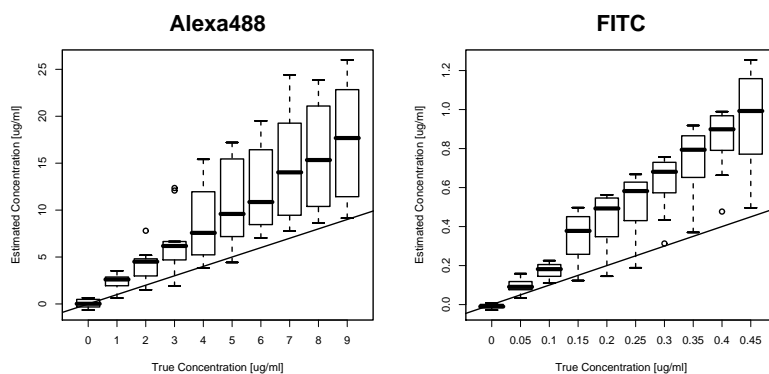


図 5 Alexa488 と FITC との組み合わせの時の真の色素濃度と推定値

この結果について考察する。Alexa-488 と Alexa-532 との組み合わせにおける推定値は真値とよく一致しているが、Alexa-488 と FITC および Alexa-532 と FITC との組み合わせにおける推定値は真値と大きく異なるものとなっている。

これは Q^2 値を比較しても明らかである。表 4 にそれぞれの組み合わせにおける各色素濃度の推定値の Q^2 値を示す。Alexa-488 と Alexa-532 との組み合わせについては 1 に近い値が得られているが、Alexa-488 と FITC および Alexa-532 と FITC との組み合わせでは負の値になってしまっている。この結果により、従来法は Alexa-488 と Alexa-532 との組み合わせについては真値に近い推定が行われるが、Alexa-488 と FITC および Alexa-532 と FITC との組み合わせには適用できないことが確認された。

表 4 それぞれの組み合わせにおける各色素濃度の推定値の Q^2 値

組み合わせ	Alexa-488,Alexa-532		Alexa-488,FITC		Alexa-532,FITC	
	Alexa-488	Alexa-532	Alexa-488	FITC	Alexa-532	FITC
Q^2	0.987	0.861	-4.20	-4.33	-3.02	-0.302

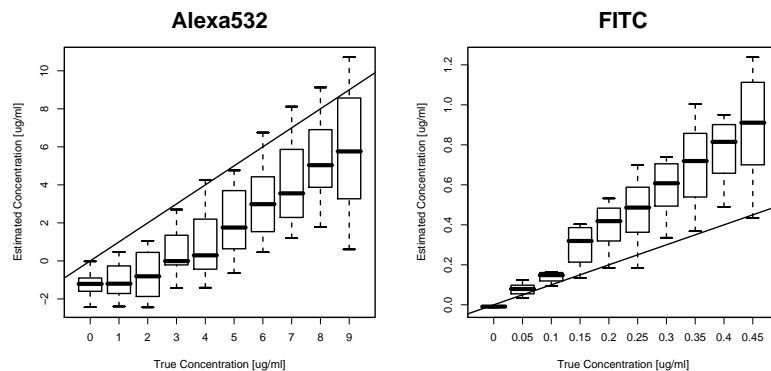


図 6 Alexa532 と FITC との組み合わせの時の真の色素濃度と推定値

4 おわりに

本稿では、分子生物学の分野で広く行われている多重蛍光染色における蛍光分離の問題について、従来手法の妥当性の検証が不十分であることを述べた。なぜならば、非線形性が指摘されている問題に対して従来手法は線形モデルを仮定しており、かつ真の蛍光強度を知ることができないので妥当性の検証が困難であったからである。

これを解決するために、各色素の濃度と混合比率とが既知の試料を測定して得られた蛍光スペクトルについての分析を行い、その線形性について検証した。

その結果、単一色素の蛍光スペクトルと色素濃度との関係は線形であることを確認した。さらに複数の色素を用いた場合についても検証し、色素の組み合わせによっては従来手法でも十分に正確な推定が可能であるが、従来手法では正しい推定が不可能な場合があることを確認した。

なお、既に筆者らは線形結合モデルを仮定できないときでも従来法に比して妥当な推定を可能にする手法を提案している [3]。しかしながら、それも十分な確度を持つとは言い難く、その改善のためには本稿で確認したような分光スペクトルそのものの性質についての議論が今後不可欠である。

参考文献

- [1] C. B. Bagwell and E. G. Adams. Fluorescence spectral overlap compensation for any number of flow cytometry parameters. *Annals New York Academy of Science*, (677):167–184, 1993.
- [2] H. Tsurui, H. Nishimura, S. hattori, S. Hirose, and K. Okumura. Seven-color fluorescence imaging of tissue samples based on fourier spectroscopy and singular value decomposition. *J. Histochem Cytochem*, 48(5):653–662, 2000.
- [3] 森下, 横田, 橋口, 姫野, 三島. 独立成分分析とロジスティック回帰による多重蛍光からの色素濃度推定. 電子情報通信学会 2004 年ソサイエティ大会講演論文集, p. 45, 徳島大学, 徳島, Sep. 2004. 電子情報通信学会.